

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-185860

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月14日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平8-343568

(22) 出願日

平成8年(1996)12月24日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

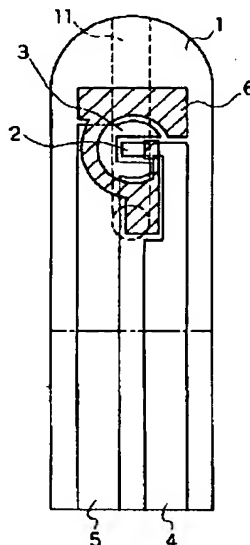
(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 測定極と対極を含む電極系上に、酸化還元酵素や電子受容体を含む反応層を設けたバイオセンサにおいて、電極部とリード部をカーボンで形成した場合に、作用極のリードの一部が試料溶液に接触し、測定結果に誤差を与えるのを防止し、特定化合物を迅速、高精度に定量できる安価なセンサを提供する。

【解決手段】 対極を略C字状とし、その凹部に作用極を配し、これらを囲んで絶縁層を設ける。基板上には、基板との間に電極部への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材を配し、前記溝は基板の端部から電極部を越えた部分まで位置し、かつ絶縁層はカバー部材の溝終端部に設けた空気孔のある位置まで延在させる。



- |       |           |
|-------|-----------|
| 1 基板  | 4,5 リード   |
| 2 測定極 | 6 絶縁層     |
| 3 対極  | 11 試料液供給路 |

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一端が電極部となり他端が測定機器との電気的接続部となる、カーボンからなる一対のリードを形成した基板、前記基板上に配されて基板との間に基板端部から前記電極部への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材、前記基板上において前記電極部の周辺を囲む絶縁層、および少なくとも酸化還元酵素と電子受容体を含有し、前記絶縁層で囲まれた電極部上に形成された反応層を具備し、前記電極部の一方は略 C 字状の対極であり、他方の電極は前記略 C 字状の凹部に位置する作用極であり、前記溝は前記基板の端部から前記電極部を越えた部分まで位置し、かつ前記絶縁層は前記カバー部材の溝終端部に設けた空気孔のある位置まで延在していることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】 前記電極部と前記電気的接続部間の電気抵抗が  $10\text{ k}\Omega$  以下である請求項 1 に記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 前記カバー部材の前記溝内にレシチン層を有する請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 反応層が、さらに親水性高分子を含む請求項 1～3 のいずれかに記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、安価に作製することができ、試料中の特定化合物を迅速、高精度、かつ簡便に定量するためのバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】スクロース、グルコースなど糖類の定量分析法として、施光度計法、比色法、還元滴定法、各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法は、いずれも糖類に対する特異性があまり高くないので精度が悪い。施光度計法によれば、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、施光度計法は、一般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。ところで、近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。

【0003】以下に、試料液中の基質の定量法の一例としてグルコースの定量法について説明する。電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4；以下 GOD と略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用して行う方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサ」講談社）。GOD は、酸素を電子受容体として、基質である  $\beta$ -D-グルコースを D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンに選択的に酸化する。酸素の存在下で、GOD による酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計る。酸素の減少量および過酸化水素の増加量は、

試料液中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースを定量することができる。上記の方法は、その反応過程からも推測できるように、測定結果は試料液に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点があり、さらに試料液に酸素が存在しない場合は測定が不可能となる。

【0004】そこで、酸素を電子受容体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子受容体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子受容体の還元体を電極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料液に含まれるグルコース濃度が求められる。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子受容体として用いることで、既知量の GOD とそれらの電子受容体を安定な状態で正確に電極上に担持させて反応層を形成することが可能となる。この場合、反応層を乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサが近年多くの注目を集めている。この使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサに試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定器で測定することができる。このような手法は、グルコースの定量だけに限らず、試料液に含まれる他の基質の定量にも応用可能である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記のような電子受容体を用い、さらに電極系と反応層を一体化する技術により、基質の簡便な電気化学的定量評価が可能となった。しかしながら、リード部に銀やパラジウム等の金属を用いると、製造コストが高くなる。また、カーボンでリード部を作製した場合は、電気抵抗の増加を抑制するためにリード部の幅を大きくする必要がある。しかし、リード部の幅を大きくすると、作用極から導出しているリードの一部が試料溶液に接触し、測定結果に正の誤差を与える場合があった。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明のバイオセンサは、一端が電極部となり他端が測定機器との電気的接続部となる、カーボンからなる一対のリードを形成した基板、前記基板上に配されて基板との間に基板端部から前記電極部への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材、前記基板上において前記電極部の周辺を囲む絶縁層、および少なくとも酸化還元酵素と電子受容体を含有し、前記絶縁層で囲まれた電極部上に形成された反応層を具備し、前記電極部の一方は略 C 字状の対極であり、他方の電極は前記略 C 字状の凹部に位置する作用極であり、前記溝は前記基板の端部から前記電極部を越えた部分まで位置し、かつ前記絶縁層は前記カバー部材の溝終端部に設けた空気孔のある位置まで延在している構成と

したものである。

【0007】ここで、前記電極部と前記電氣的接続部間の電気抵抗は、 $10\text{ k}\Omega$ 以下とするのが好ましい。また、前記カバー部材の前記溝内に、特に溝の全長にわたってレシチン層を設けることが好ましい。反応層は、親水性高分子を含むことが好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を説明する。図1は本発明によるバイオセンサの基板を示す平面図、図2は同バイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。これらの図において、1はポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板を示す。この基板1上には、カーボンからなる作用極2、対極3、および各電極に連なるリード4、5が形成されている。これらの電極およびリードは、バインダーを含むカーボンペーストを一回のスクリーン印刷により同時に形成したものである。対極3は略C字状に形成されており、作用極2は略C字状の対極3の凹部内に配されている。これらの電極に連なるリード4および5は、基板1の一方の端部まで延びており、その端部は測定機器との電氣的接続部となる。

【0009】上記のようにして測定極2、対極3、およびリード4、5を形成した基板1上には、さらに、測定極2および対極3をそれらのリード4および5と区画するための電気絶縁層6が絶縁性ペーストの印刷により形成されている。この電気絶縁層6により、作用極および対極の露出面積が規定される。電気絶縁層6の内縁部は、図示のように、作用極の部分を除いてほぼ円形となるように形成するのがよい。こうして電極系を形成した基板1上には、反応層を形成する。反応層は、後述するように、各種試薬の溶液を電極系上に滴下し、乾燥することにより形成するのが簡便である。この際、カーボンからなる電極部分が電気絶縁層6で囲まれているので、反応層を特定部分に限定して形成するのに有利である。すなわち、反応層形成用溶液がリード部へ拡がるのを抑制する。これにより均質な反応層を再現性よく作製することができる。

【0010】一方、この基板1に組み合わされて基板との間に試料液供給路を形成するためのカバー部材は、一端に開放するスリット8を設けたスペーサ7、およびスリット8の終端に対応する位置に空気孔10を設けたカバー9から構成されている。スペーサ7およびカバー9は、基板と同様の絶縁性材料から作られており、これらを図2の一点鎖線で示す部分が一致するように張り合わせることでバイオセンサが完成する。このバイオセンサは、基板1上に、図1に示す点線で囲まれた部分11に試料液供給路が形成される。この試料液供給路11は、スペーサ7のスリット8に対応するもので、電極系を越えた部分まで延びている。試料液供給路11の開口部に試料液を接触させれば、試料液は毛管現象により

試料液供給路を空気孔10側へ吸引され、電極系上に達し、そこで反応層の試薬と反応する。

【0011】図1から明らかなように、試料液供給路に面する基板1上においては、電極系を構成する限定された作用極2および対極3と、電極系の前後を囲む電気絶縁層6の部分が露出している。そして、作用極2と電気絶縁層6によって区画されたリード4は、電気絶縁層6によって試料液供給路11とは隔離されているので、試料液が作用極2のリード4に接触することによる測定誤差を避けることができる。なお、対極3のリード5の一部が試料液供給路11に露出しているが、ここに試料液が接触しても測定値に影響は及ぼさない。

【0012】カーボンからなる作用極、対極、およびそれらのリード部は、これらの上に、電気絶縁層を形成するためのペーストを塗布すると、ペーストがカーボン層に浸透するため電気抵抗が増大する場合がある。そこで、カーボンの印刷層上においては、作用極および対極をそれらのリード部と区画するための電気絶縁層は、図1のように、ごく限定された領域にするのが好ましい。

【0013】

【実施例】

《実施例1》バイオセンサの一例としてグルコースセンサについて説明する。グルコースセンサは以下のようにして作製した。図1のように、作用極2、対極3、およびそれらに連なるリード4、5、電気絶縁層6を基板1上に形成した。次に、作用極2および対極3からなる電極系上に、酵素としてGOD、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることにより反応層を形成した。図1に示すように、電極系の周囲にも電気絶縁層6を配置したため、滴下した反応層形成用溶液のリード部への拡がりを大幅に抑制することができる。次に、前記反応層上に、試料液の反応層への供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を反応層上にわたって広げ、乾燥させることによりレシチン層を形成した。次に、基板1にカバー9およびスペーサ7を接着してグルコースセンサを作製した。

【0014】このセンサに、試料液としてグルコース水溶液 $3\mu\text{L}$ を試料液供給路11の開口部から供給した。試料液の供給と同時に電極系上の反応層が溶解した。55秒経過後、対極3を基準にして所定の電位を作用極2に印加し、5秒後の電流値を測定した。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、GODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンを酸化する電流が応答として得られる。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した電流値が得られた。

【0015】《実施例2》実施例1と同様に作製した基板の電極系上に、カルボキシメチルセルロースのナトリ

ウム塩（以下、CMCで表す。）の水溶液を滴下し、乾燥させることによりCMC層を形成した。次に、前記CMC層上に、酵素としてGOD、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることにより反応層を形成した。次に、スぺーサ7とカバー9を接着により一体化し、スぺーサ7のスリット8により形成されるカバー部材の溝の電極系と対応する領域に、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を滴下し、乾燥させた。こうしてカバー部材側に形成したレシチン層は、試料液の反応層への供給をより一層円滑にするのに役立つ。レシチンの有機溶媒溶液を反応層上に直接滴下した場合には、その溶液がカーボンのリード部まで拡がり、電極部—電氣的接続部間の電気抵抗を増加させる場合がある。しかし、上記のように、カバー部材側にレシチン層を形成することにより、この課題は解決される。

【0016】次に、上記レシチン層を形成したカバーとスぺーサが一体のカバー部材を基板1に接着してグルコースセンサを作製した。このセンサに、試料液としてグルコース水溶液3 $\mu$ 1を試料液供給路の開口部から供給した。試料液の供給と同時に電極系上の反応層が溶解し、5秒経過後、対極3を基準にして所定の電位を作用極2に印加し、5秒後の電流値を測定した。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した電流値が得られた。本実施例においては、反応層にCMCを含むため、酵素の電極表面への吸着等が抑制され、よりよい応答特性が得られた。

【0017】《実施例3》カーボン層の厚さを変化させた以外は、実施例2と同様にグルコースセンサを作製した。カーボン層の厚さを変化させることで、作用極—電氣的接続部間および対極—電氣的接続部間の電気抵抗値が5～15k $\Omega$ の電極を数種類作製した。実施例2と同様にセンサ応答特性を評価した結果、前記抵抗値が10k $\Omega$ 以下の電極を用いた場合に良好なセンサ応答特性が得られた。

【0018】上記実施例においては、親水性高分子としてCMCを用いたが、親水性高分子層を形成する親水性高分子には、種々のものが使用される。例えば、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩、メタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩があげられる。その中でも、CMC、HEC、HPC、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロースが好ましい。ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリ

ビニルアルコール、ポリスチレンスルホン酸なども使用できる。

【0019】反応層に含有される酸化還元酵素としては、測定対象とする基質に応じて変える必要がある。酸化還元酵素としては、例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどがあげられる。上記電子受容体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体などがあげられる。また、酵素を電子受容体とした場合にもセンサ応答が得られる。電子受容体は、これらの一種または二種以上が使用される。上記酵素および電子受容体は、試料液に溶解させてもよく、反応層を基板などに固定することによって試料液に溶けないようにしてもよい。酵素および電子受容体を固定化する場合、反応層は、上記親水性高分子を含有することが好ましい。

【0020】さらに、反応層は、pH緩衝剤を含有し得る。pH緩衝剤としては、リン酸二水素カリウム—リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム—リン酸二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム—リン酸二カリウム、リン酸二水素ナトリウム—リン酸二ナトリウム、クエン酸—リン酸二ナトリウム、クエン酸—リン酸二カリウム、クエン酸—クエン酸三ナトリウム、クエン酸—クエン酸三カリウム、クエン酸二水素カリウム—水酸化ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム—水酸化ナトリウム、マレイン酸水素ナトリウム—水酸化ナトリウム、フタル酸水素ナトリウム—水酸化ナトリウム、コハク酸—四ホウ酸ナトリウム、マレイン酸—トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン—トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩塩、[N—（2—ヒドロキシエチル）ピペラジン—N'—2—エタンスルホン酸]—水酸化ナトリウム、[N—トリス（ヒドロキシメチル）メチル—2—アミノエタンスルホン酸]—水酸化ナトリウム、[ピペラジン—N，N'—ビス（2—エタンスルホン酸）]—水酸化ナトリウムがあげられる。

【0021】上記実施例では、カーボン、および絶縁ペーシトの印刷パターンについて、特定の例を図示したが、パターンはこれらに限定されるものではない。

【0022】

【発明の効果】以上のように本発明によると、安価であり、かつ迅速、高精度な試料中の特定化合物の定量を簡便に実施することのできるバイオセンサを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサに用いた電極系を有する基板の平面図である。

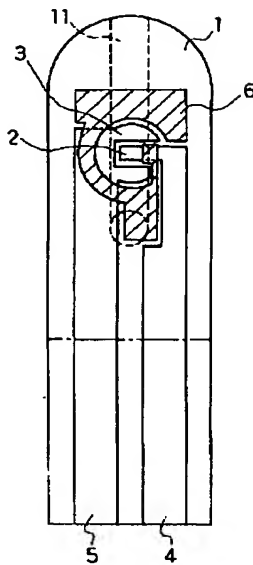
【図2】同センサの反応層を除いた分解斜視図である。

## 【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板  
2 作用極  
3 対極  
4、5 リード  
6 電気絶縁層

- 7 スペーサ  
8 スリット  
9 カバー  
10 空気孔  
11 試料液供給路

【図 1】



- 1 基板                      4,5 リード  
2 測定極                  6 絶縁層  
3 対極                      11 試料液供給路

【図 2】

